

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**LAUANA LUIZA BENTO**

**USO DE PCR-RFLP NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM  
SUÍNOS**

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**LAUANA LUIZA BENTO**

**USO DE PCR-RFLP NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM  
SUÍNOS**

Projeto de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência para obtenção do Diploma  
de Graduação em Zootecnia da  
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira  
Lima

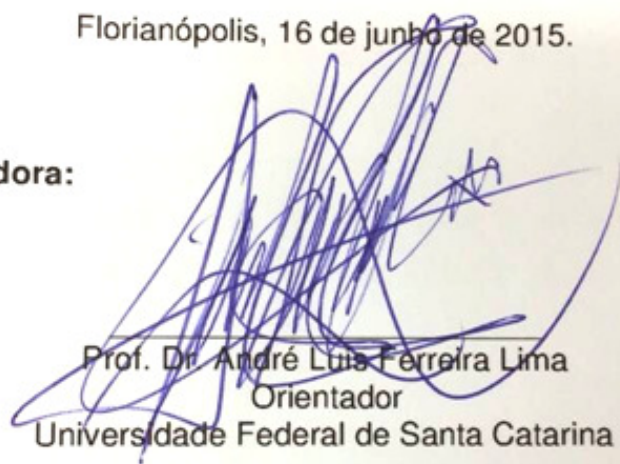
**FLORIANÓPOLIS - SC  
2015**

Lauana Luiza Bento

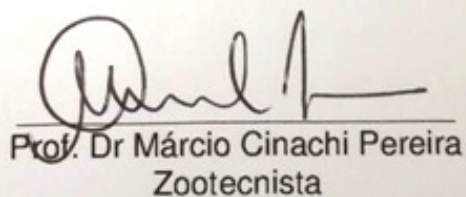
Esta Monografia de Projeto de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 16 de junho de 2015.

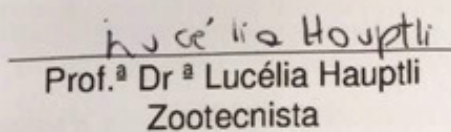
**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. André Luis Ferreira Lima  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira  
Zootecnista



Prof.ª Dr.ª Lucélia Hauptli  
Zootecnista

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu eterno anjo, Evaldo.  
“Saúde e Paz”.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus por todos os momentos em que ele me deu saúde e força para seguir mesmo com dificuldades.

Agradeço ao meu eterno anjo protetor, meu pai, Evaldo da Silva Bento, que sempre me apoiou e me mostrou o que é amor verdadeiro, além de nos momentos difíceis me dar forças para continuar e sei que mesmo em outro plano ele me guia em todas as minhas escolhas. À minha mãe que mesmo com um jeito durona se mostra sempre presente e me ajudando em todos os momentos. Ao meu irmão que sempre me apoiou e seguiu comigo.

Ao meu namorado e melhor amigo, que aturou todas as minhas fases e sempre me compreendeu e me incentivou por acreditar no meu potencial e por trilhar comigo os meus sonhos. À família do meu namorado por nos incentivarem a lutar pelos nossos sonhos.

À minha família, minhas tias, tios, minha avó e meus primos por todos os apoios e as risadas em todas as reuniões de família. Agradeço também em especial meu primo Bruno que considero um irmão, e peço desculpas por todos os momentos ausentes.

Aos meus colegas de faculdade Roberto e Daiane, por todas as parcerias e momentos de dificuldades que superamos juntos.

Ao meu professor, amigo e orientador Prof<sup>º</sup> André Luís Ferreira Lima por me aceitar como orientada apesar das circunstâncias e pela oportunidade de desenvolver meu estágio e trabalho de conclusão de curso no LEPGA. Por todos os momentos de tensão e de alegria durante esse período e por todos os outros que ainda virão, pois me despertou ainda mais o amor pela pesquisa e pela genética.

Aos colegas do LEPGA, e principalmente as minhas amigas Andrielle e Tuanne, que sempre estiveram presentes em todas as etapas deste trabalho.

À minha família do estágio de vivência, Flávio, Juliana, Ana Júlia e Fernanda, por me acolherem nesta fase importante da faculdade e por hoje fazerem parte da minha família.

À todos os meus amigos que apesar da ausência em alguns momentos me entenderam e me apoiaram no meu sonho.

## RESUMO

O gene do hormônio grelina é considerado um candidato para a identificação de marcadores genéticos relacionados à produção de suínos, pois está envolvido em diversas funções biológicas além de estimular o consumo alimentar e afetar a conversão alimentar, sendo esses últimos aspectos econômicos muito importantes na suinocultura, o qual poderiam ser otimizados nos programas de melhoramento genético da espécie. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a possível existência de polimorfismos no gene da grelina em reprodutores suínos através da técnica de PCR- RFLP com a enzima de restrição Pst I (Invitrogen®). Foi realizada a coleta de pêlos e seus respectivos folículos pilosos de um grupo de 40 animais sendo 9 machos e 10 fêmeas da raça Large White e 15 machos e 6 fêmeas da raça Landrace, todos de uma granja de reprodutores de Santa Catarina. Os experimentos de identificação de polimorfismo no gene em estudo foram realizados no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras de folículos pilosos foram submetidas à extração de DNA pelo método de PCI (fenol-clorifórmico-álcool-isoamílico) adaptada e o DNA genômico extraído foi quantificado e amplificado mediante a PCR. Para verificar o resultado da reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese e o fragmento obtido foi submetido à técnica de PCR-RFLP utilizando-se a enzima de restrição Pst I (Invitrogen®). Como resultado observou-se que a extração de DNA e a realização da técnica de PCR e PCR-RFLP se mostraram eficientes porém a utilização da técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição Pst I não possibilitou a identificação de polimorfismo no gene do hormônio da grelina nos animais avaliados.

**Palavras-chave:** Suinocultura; GHRL; Marcadores Moleculares; Conversão Alimentar; Consumo;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA através de eletroforese em gel de Agarose a 0,5%.....	25
Figura 2: Gradiente de temperatura para PCR em termociclador Biometra®...	25
Figura 3: Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores GHR, FWD e REV. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).....	26
Figura 4: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease Pst I. Gel de Agarose à 3%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®) . C+= controle positivo com produto de PCR..	26

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA<sub>m</sub> - Ácido Ribonucleico mensageiro

GH – Growth Hormone

GHRH – Growth Hormone Releasing Hormone

PSE – Pale, soft and exudative

RAPD - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SFP – Single Feature Polimorfism

Taq – *Termus aquaticus*

PCR-RFLP - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição

PCR-SSCP - Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples

RPM – Rotação por minuto

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

V - Volts



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS .....	12
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
3.1 Suinocultura .....	13
3.2 O hormônio Grelina .....	14
3.3 Marcadores Moleculares e Polimorfismos do tipo SNP .....	16
3.3.1 Melhoramento genético e técnicas de marcação molecular .....	16
3.3.2. Polimorfismos do tipo SPN (Single Nucleotide Polymorphisms) .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
6. CONCLUSÃO .....	278
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	299

## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína representa grande parte da produção e consumo mundial de carnes quando comparada à outras espécies animais. O Brasil vem se destacando no mercado de carnes como um dos principais produtores e exportadores, isto devido ao aumento do incremento tecnológico e da especialização e coordenação entre os elos da cadeia produtiva, desta forma o melhoramento genético da espécie ganha importância cada vez maior. Um programa de melhoramento genético de suínos visa à obtenção de animais com bons índices de taxa de crescimento e eficiência alimentar, animais de abate com grande quantidade e qualidade de carne e fêmeas com grande capacidade reprodutiva e habilidades maternas, conseqüentemente tem-se um maior retorno econômico na atividade suinícola.

As perspectivas para o melhoramento genético têm sido continuamente influenciadas pelos avanços de várias áreas das ciências e a era da biotecnologia tem despertado grandes expectativas quanto aos seus efeitos no melhoramento genético animal por meio das técnicas moleculares, como a seleção assistida por marcadores, a qual é uma ferramenta capaz de aumentar a acurácia de predição quando associada aos métodos tradicionais de seleção, aumentando a qualidade e diminuindo a variação da matéria produzida, propiciando assim um melhor controle dos produtos gerados. O estudo de polimorfismos em genes candidatos tem como objetivo identificar marcadores moleculares, que possam ser utilizados em programas de seleção para melhoria de características difíceis de serem medidas ou com baixos coeficientes de herdabilidade, mas que possuem importância econômica na suinocultura.

Para identificação de genes candidatos pode-se utilizar três estratégias como, a análise de genes conhecidos com base em informações de fisiologia (hormônio ou receptores ligados a reprodução), mutações observadas em outras espécies e resultados observados em animais transgênicos. O gene do hormônio grelina é considerado um candidato para a identificação de marcadores genéticos relacionados à produção de suínos, este por sua vez é produzido pela parede do estômago e estimula o consumo alimentar pela ação que o mesmo exerce sobre o hipotálamo além de outras funções biológicas já

estudadas como regulador endógeno da liberação do hormônio do crescimento, o crescimento e desenvolvimento tecidual, aumento da mobilidade gastrointestinal e auxílio na secreção de enzimas pancreáticas.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo identificar polimorfismo no gene do hormônio grelina (GHRL) em reprodutores suínos e associá-los a características de importância econômica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a existência de polimorfismos no gene do hormônio grelina em reprodutores suínos através da técnica de PCR- RFLP com a enzima de restrição Pst I.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Extrair o DNA genômico de uma amostra de animais;
- Isolar e amplificar um fragmento correspondente ao éxon I e intron I do gene da Grelina utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos na PCR, utilizando-se a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Suinocultura

A carne suína é considerada a mais consumida no mundo e, portanto assume grande importância no mercado global de carnes (PEREIRA, 2012). Além de ser uma importante fonte de proteínas e vitaminas do complexo “b” possui um nível de colesterol igual ou menor que as outras carnes (TRAMONTINI, 2000). Nos últimos 20 anos a evolução genética da espécie levou a redução de 31% da gordura da carne, 14% de calorias e 10% do colesterol, fazendo com que a carne suína fosse mais consumida devido aos seus aspectos de baixo teor de gordura, alto teor nutritivo e seu sabor característico (MAPA, 2014).

O Brasil detém a quarta posição no “ranking” de produção mundial de carne suína com um total de 3370 mil toneladas em 2013, no mesmo ano foram exportadas cerca de 494.228 toneladas de carne suína e no país a produção esta concentrada principalmente nos estados do Sul do Brasil, sendo 25,1% em Santa Catarina, 19,3% no Rio Grande do Sul e 17% no Paraná (ABIEPCS, 2013b). Segundo o IBGE (2013) o maior rebanho esta situado em Santa Catarina, seguido do Rio Grande do Sul e Paraná.

Segundo Tramontini (2000) o desenvolvimento da suinocultura constitui-se em um importante fator de crescimento econômico nacional, pois provoca efeitos multiplicadores de renda e emprego em todos os setores econômicos da cadeia, aumenta a demanda de insumos agropecuários e a expansão da comercialização e industrialização da produção.

O melhoramento da composição genética dos animais aliado as condições de ambiente de criação pode acarretar em níveis altos de produção sendo a parte genética a base para o estabelecimento de programas de melhoramento e o fator que limita a capacidade de resposta dos animais aos processos seletivos (PEREIRA, 2012). Segundo Rossi et.al. (2013) o máximo desempenho animal é alcançado através de dietas com altas concentrações nutricionais e elevado custo que por sua vez representa, mais de 70% dos custos totais de produção. Dessa forma, maximizar a eficiência alimentar com a

redução dos custos de produção está entre os principais desafios da cadeia suinícola (NOBLET et. al., 2001).

Com estes dados demonstra-se a importância econômica e social da suinocultura no cenário brasileiro e catarinense. Levando em consideração a nutrição e o melhoramento genético da espécie, o desenvolvimento de um estudo molecular com identificação de genes candidatos ganha cada vez mais espaço, visando proporcionar uma ferramenta aplicável em termos populacionais e que possa ser aliado a valores de eficiência alimentar da espécie.

### **3.2 O hormônio Grelina**

Em 1999, Kojima et.al., identificaram a grelina como um hormônio gastrointestinal existente no estômago de ratos (ROMERO & ZANESCO, 2006). Após esta descoberta, o estudo deste hormônio se tornou cada vez mais intenso em outras espécies animais tais como humanos, pássaros, peixes, dentre outras (DONG et. al., 2009).

Este hormônio é considerado um peptídeo constituído de 28 aminoácidos que possui uma modificação octanóica no seu grupo hidroxil sobre a serina<sup>3</sup>, que é essencial para o desempenho de sua função liberadora de GH (BEDNAREK et al., 2000). Produzido, predominantemente, pelas células Gr do trato gastrointestinal e em menores quantidades no sistema nervoso central, rins, placenta e coração (KOJIMA et.al., 1999; DATE et.al., 2000; GUALILLO, 2001). Alguns estudos relatam que as células produtoras de grelina tinham uma expressão abundante no estômago de bovinos, ovelhas, suínos e equinos, além da região pilórica do estômago e trato gastrointestinal de suínos (HAYASHIDA et.al., 2001; WIERUP et.al., 2007).

Dentre os fatores responsáveis pela regulação da secreção de grelina, a alimentação é o mais conhecido (CUMMINGS et.al., 2001). Segundo Sato et al. (2012) têm-se conhecimento que a concentração de grelina no plasma sanguíneo aumenta quando em jejum, e diminui após a ingestão de alimentos. O nível de glicose no sangue pode ser considerado um candidato provável na regulação da mesma, pois a sua administração oral ou intravenosa diminui a concentração de grelina no plasma (SHIYA et.al., 2002).

Além de ser conhecido como o único hormônio estimulante do apetite do intestino, a grelina possui diversas funções biológicas (KAIYA et. al., 2008). A principal função deste hormônio é a regulação do consumo de ração, peso corporal e motilidade gastrointestinal (TOSHINAI et al., 2006). Além de desempenhar um papel na regulação do balanço e homeostase de energia em vertebrados; regula o crescimento e desenvolvimento tecidual e ainda promove a proliferação celular intestinal e inibe sua apoptose durante os estados inflamatórios e estresse oxidativo (MOLIK et. al., 2011; KAIYA et. al., 2008). Em ratos, uma injeção de grelina levou a um aumento da ingestão de alimentos, diminuiu as despesas de energia e, finalmente, resultou no ganho de peso corporal (NAKAZATO et.al., 2001).

No que se diz respeito a estimulação do apetite causada pela grelina, esta ocorre através da ativação e estimulação de neuropeptídeos hipotalâmicos orexígenos, como o NPY (COWLEY et. al., 2003). Ela tende a atuar como um sinal da fome dos tecidos periféricos, informando o cérebro sobre o conteúdo de nutrientes no estômago (DONG et. al., 2009), de modo que injeções intravenosas e subcutâneas desse hormônio estimulam os neurônios do hipotálamo, aumentando assim a ingestão de alimentos. Após a injeção intravenosa, a liberação de GH atinge seu pico em no máximo quinze minutos, a partir das células primárias da pituitária. Por outro lado, a indução da liberação de GH após a injeção de grelina é diminuída drasticamente quando o nervo vago é rompido, indicando a importância desse nervo para os efeitos estimulantes da grelina (SATO et. al., 2011).

Outro papel fisiológico da grelina é na regulação da motilidade gastrointestinal, acelerando o esvaziamento gástrico (DONG et. al., 2009). Segundo Du et. al. (2007) em um estudo feito com leitões desmamados, a grelina agiu em células da mucosa gástrica para estimular a secreção de ácido gástrico, in vivo e in vitro. Após o nascimento, enquanto que o trato gastrointestinal de leitões sofre mudanças substanciais de desenvolvimento em relação à estrutura e função, logo resulta-se em adaptação às novas condições alimentares, e o desenvolvimento do trato GI é muitas vezes perturbado, levando então a conclusão de que a contribuição da grelina para o desenvolvimento do aparelho GI é positiva (HEDEMANN et.al., 2003; KOTUNIA et. al., 2006; MC CRACKEN et. al., 1999).

Levando em consideração todos os fatores biológicos em que este hormônio está relacionado, a utilização de técnicas de marcação molecular no gene deste hormônio em populações de suínos deve ser considerada, pois permite a identificação de polimorfismos genéticos que podem estar associados a características fenotípicas de interesse na suinocultura, que possam apresentar retornos econômicos, como por exemplo a conversão alimentar.

### **3.3 Marcadores Moleculares e Polimorfismos do tipo SNP**

#### **3.3.1 Melhoramento genético e técnicas de marcação molecular**

Segundo Euclides Filho (1999) a utilização de animais domésticos não serve só como componentes primários indispensáveis ao desenvolvimento e prosperidade do homem, mas também podem ser considerados elementos pró-ativos do desenvolvimento tecnológico. A partir do século XX a produção animal deixou de ser uma atividade apenas de subsistência e passou a ser conduzida como uma atividade comercial. Portanto ocorreu uma grande demanda por animais que apresentassem um melhor desempenho além de que fossem mais bem adaptados às diversas condições ambientais (COUTINHO & ROSÁRIO, 2010).

Uma descrição do melhoramento genético animal é o resultado obtido através de um processo de direção dos acasalamentos efetuados em raças ou linhas puras para a obtenção de ganho genético e fenotípico, em características de interesse econômico da produção animal. Para resultados positivos com relação a acasalamentos desejáveis são identificados os melhores reprodutores, machos ou fêmeas, através do valor genético da característica de interesse para a seleção. Deve-se levar em conta que o valor genético de cada indivíduo, para cada característica, é considerado o resultado líquido de uma combinação estatística da frequência de locus e genes com efeitos positivos e negativos para aquela característica, na presença das demais características de interesse, somados ao longo de todo o genoma do animal (PEIXOTO; LEDUR; FIGUEIREDO, 2014).



Ao longo dos anos algumas interações entre espécies e ambiente têm sido estudadas por meio de observações de campo e manipulações experimentais. Apesar de o uso de dados fenotípicos para inferir variação genética de populações é bastante questionável, pois a variação genética poderia ser subestimada (ou superestimada) se fosse baseada unicamente em dados fenotípicos, porém alguns estudos fornecem dados fenotípicos, que podem ser baseados em um ou mais aspectos da morfologia, fisiologia ou comportamento das espécies. Embora algumas características fenotípicas estejam sob estrito controle genético, fatores ambientais podem influenciar a relação entre o genótipo e o fenótipo de um indivíduo (FREELAND, 2005; PAMILO, 1988). Por isso, a complexa interação entre genótipo, fenótipo e ambiente pode ser considerada um dos principais motivos que impulsionaram o desenvolvimento de marcadores moleculares para o estudo genético de espécies (SILVA, 2012).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do ácido desoxirribonucleico (DNA), culminando com o surgimento dos marcadores moleculares (GUIMARÃES, 2009b). Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos na década de 1960, eram conhecidos como alozimas e baseados em enzimas. Alozimas são múltiplas variantes de uma mesma proteína que ocorrem quando sequências de DNA de dois ou mais alelos, em um mesmo locus, são suficientemente divergentes e, então, o RNA correspondente codifica diferentes aminoácidos, dando origem a múltiplas variantes de uma mesma proteína. Porém levando em consideração que nem toda mutação na sequência de DNA resulta em mudanças na sequência de aminoácidos, considera-se uma das desvantagens da utilização de alozimas como marcadores moleculares. As limitações e desvantagens do uso de alozimas impulsionaram, anos depois, o desenvolvimento de marcadores genéticos baseados em DNA (FREELAND, 2005; SCHLÖTTERER, 2004).

O estudo do DNA, ao contrário das proteínas, apresenta grande estabilidade, podendo ser analisado anos depois de coletado a partir de qualquer tecido orgânico que apresente células nucleadas, tal como sêmen, pele, sangue e folículos pilosos (GUIMARÃES, 2009b). Os marcadores moleculares são amplamente utilizados no mapeamento e nas análises de

similaridade além de estudos de genética populacional, e podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA específico, expresso ou não (BRAMMER, 2000). A seleção assistida por marcadores molecular tem como objetivo aumentar a precisão da avaliação genética dos indivíduos, proporcionando assim, melhor controle sobre os processos de produção, bem como sobre os produtos gerados, aumentando a qualidade e diminuindo a variação da matéria existente (GIL, 2012).

Nas décadas de 80 e 90, os marcadores RFLP, RADP e AFLP foram os marcadores de DNA principais utilizados, sendo ainda é feita a utilização destes para alguns estudos genéticos (GUIMARÃES et. al., 2009a). A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR utilizando *primers* de sequência arbitrária com aproximadamente 10 nucleotídeos. Por utilizar *primers* de sequência arbitrária, esta técnica permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada. A técnica de RAPD mostra-se especialmente indicada por ter grande potencial para detectar polimorfismo genético e por permitir a obtenção rápida de resultados (LACERDA et. al., 2002). A técnica de AFLP consiste na digestão do DNA através da utilização de enzimas de restrição e posterior amplificação via PCR. Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP. Como vantagem dessa técnica pode-se citar fato de não haver a necessidade do conhecimento prévio de dados da sequência de DNA para a construção dos *primers* utilizados ea geração de grande número de polimorfismos por reação (FALEIRO, 2007). O marcador RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) que permite a observação de polimorfismos por corte da fita dupla do DNA pelo uso das enzimas de restrição e hibridização destes fragmentos com uma sonda de DNA homóloga e marcada com radioatividade ou quimiofluorescência, tem como objetivo a caracterização individual (GUIMARÃES, 2009b).

Os microssatélites consistem em unidades curtas, de aproximadamente dois a cinco pares de bases, repetidas uma após a outra em tandem (LITT & LUTY, 1989). A obtenção desses marcadores envolve a amplificação dos microssatélites através da PCR, utilizando *primers* específicos para as regiões

que flanqueiam os microsatélites e posterior análise em eletroforese (FALEIRO, 2007).

Os SFP e SNPs são marcadores moleculares que possuem como base as informações de sequências de DNA. Os marcadores do tipo SFP, referem-se aos microarranjos de DNA ou chips, que contêm oligonucleotídeos desenhados para estudos de expressão gênica, os mesmos estão sendo usados para a geração de polimorfismos para genotipagem em grande escala (GUIMARÃES et. al., 2009a). Os SNPs são utilizados para identificação de mutações e polimorfismos baseados na variação da posição de um único nucleotídeo (FALEIRO, 2007).

Mais recentemente, o advento de técnicas baseadas em PCR apresentou uma nova opção ao uso de marcadores moleculares (BRAMMER, 2000). Esta técnica foi desenvolvida em meados da década de 80 e alcançou uso disseminado e extenso em diversas áreas de biologia quase que imediatamente (WHITE et. al., 1989). A técnica de PCR é utilizada para ampliar pequenas seqüências específicas de nucleotídeos em quantidades acessíveis à análise, a partir de ínfima quantidade de DNA. Baseia-se na síntese enzimática in vitro de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase e de *primers* específicos ou não. Tais *primers* delimitam a seqüência de DNA de fita dupla a ser amplificada, cujos resultados são milhões de cópias idênticas (MULLIS & FALOONA, 1987; WHITE et. al., 1989). Os passos envolvidos nesse processo são executados por um aparelho chamado de termociclador e resumem-se nas seguintes etapas: a desnaturação onde o DNA molde é aquecido até 94-95°C, fazendo com que o DNA, originalmente fita dupla, seja desnaturado em duas fitas simples; o anelamento que é realizada através da redução da temperatura até aquela considerada ótima para os *primers* que estão sendo usados no experimento, podendo ficar entre 30 - 40°C para *primers* aleatórios, não específicos, ou entre 50 - 70°C, para experimentos gene-específicos. Nesta etapa, os *primers* se anelam a regiões homólogas do genoma. O terceiro passo é a polimerização, esta etapa é executada a 72°C, que é a temperatura ótima para a enzima Taq polimerase, que procede então, a partir dos *primers* a polimerização das fitas complementares, transformando o que era a princípio uma fita dupla de DNA em duas fitas duplas. Deste modo, ao final dos ciclos, têm-se mais de 1 bilhão

de cópias da sequência alvo, permitindo que a partir de quantidades ínfimas de DNA genômico possa se proceder a análise completa dos mais diversos sistemas gênicos (GUIMARÃES, 2009b).

Segundo Mullis (1990), um estudo feito em 1955 por Arthur Konberg e seus colaboradores, em resposta a utilização do fragmento de Klenow de *E. coli* DNA polimerase, descobriu que esse fragmento de *E. coli* apresentava uma temperatura ótima de 37° C, porém, era inativado através das altas temperaturas necessárias para a separação das fitas de DNA, necessitando a adição de uma nova enzima a cada ciclo de PCR. A partir da introdução de um DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) no primeiro ciclo de PCR, eliminou-se a necessidade de quaisquer outras adições de enzimas (ERLICH, 1989). A enzima Taq polimerase possui como uma de suas funções sintetizar uma nova cadeia de DNA, promovendo o alongamento dos oligonucleotídeos iniciadores, através da fixação de um nucleotídeo complementar à sua extremidade (GUIMARÃES, 2009b).

A PCR é utilizada como primeira etapa nos procedimentos laboratoriais da técnica de PCR-RFLP. A PCR-RFLP é uma técnica popular para genotipagem, na qual os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. O primeiro passo para análise é a amplificação de um fragmento contendo a variação, seguido por tratamento do fragmento amplificado com uma enzima de restrição pertinente. Cada enzima cliva o DNA em sequências nucleotídicas específicas. Dado que a presença ou ausência do reconhecimento das enzimas de restrição resulta na formação de fragmentos de restrição de diferentes dimensões, a identificação dos alelos pode ser feito por eletroforese (RASMUSSEN, SD).

### **3.3.2. Polimorfismos do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)**

Os SNPs são marcadores moleculares do DNA utilizados para identificação de mutações e polimorfismos baseados na posição de um único nucleotídeo (CHO et. al., 1999). Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) são oriundos de variações existentes na sequência de DNA dos indivíduos de uma mesma população, variações essas, geradas por substituição de uma única base ou pequenos eventos de inserção e deleção

das mesmas (FALEIRO, 2007). Na maioria dos casos a substituição de um único nucleotídeo leva à substituição de um aminoácido da proteína e, por consequência, à modificação fenotípica e à perda da funcionalidade da proteína (SOORI et al., 1999). Para que seja considerado um polimorfismo, é necessário que os alelos existam em frequências maiores do que ocorria devido a mutações recorrentes (PEREIRA, 2012).

O estudo dos polimorfismos do tipo SNP pode ser dividido em duas etapas. A primeira consiste na identificação do polimorfismo, na qual a sequência genética de vários indivíduos é comparada e segunda refere-se à genotipagem. Para o processo de genotipagem, pode-se utilizar diversas técnicas, tais como chips de DNA, espectrometria de massa, PCR em tempo Real e RFLP e a escolha da técnica mais adequada depende de fatores tais como precisão, agilidade e custo (VIGNAL et. al., 2002). A técnica da RFLP é a mais utilizada, uma vez que apresenta baixo custo e rapidez de execução quando aplicada em estudos populacionais, além de sua alta reprodutibilidade e seu alcance de ampla cobertura do genoma (GUIMARÃES, 2009b).

A principal vantagem dos SNPs é a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismos entre alelos de determinado gene e as principais desvantagens consistem na necessidade de conhecimento prévio de sequência do gene de interesse e o custo/infra-estrutura da técnica envolvido nas etapas do sequenciamento dos diferentes fragmentos do DNA de interesse (FALEIRO, 2007).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A etapa de coleta de dados foi realizada em granjas de reprodutores suínos pertencentes ao frigorífico Riosulense, município de Rio do Sul/SC no mês de agosto de 2013. Foram coletadas as amostras de pelos da região lombar de 40 animais, sendo 9 machos e 10 fêmeas da raça Large White e 15 machos e 6 fêmeas da raça Landrace. Os animais integram um programa de melhoramento genético da espécie e são de linhagens de avós e bisavós se tratando da pirâmide de produção. Cada amostra contendo aproximadamente 50 pêlos foi acondicionada em embalagem individual e devidamente identificada. Posteriormente, cerca de 30 folículos/animal foram transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5 ml) identificados com a numeração do animal e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do DNA genômico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis/SC.

Para a etapa de extração do DNA genômico dos folículos pilosos, utilizou-se a metodologia PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool-isoamílico), adaptada de Lima (2003). Inicialmente, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução TE-TWEEN em cada tubo, seguido de incubação em banho maria  $65^{\circ}\text{C}$  por 1,5 horas, posteriormente adicionou-se 8  $\mu\text{L}$  de proteinase K (20mg/mL) e incubou-se a  $55^{\circ}\text{C}$  por 6 horas, ao final, incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas.

Ao final da incubação, adicionou-se 1 volume de PCI (fenol-clorifórmio-álcool-isoamílico – 25:24:1) para um volume de amostra e agitou-se os tubos vigorosamente por 10 segundo em agitador automático. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a  $23^{\circ}\text{C}$ , sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, resultando em um volume final de aproximadamente 300  $\mu\text{L}$ .

Em seguida, foi executada a precipitação do DNA com 50  $\mu\text{L}$  acetato de sódio 0,3 M e 1000  $\mu\text{L}$  etanol absoluto gelado. Prosseguiu-se com uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 25 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalizou-se com o descarte do sobrenadante, sendo o DNA remanescente seco a temperatura ambiente e em seguida armazenado em 40  $\mu\text{L}$  de água ultra pura a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após as extrações, as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro

(Nanodrop 1000, ThermoScientific®) utilizando-se como parâmetro as amostras que apresentaram concentração igual ou superior a 100 ng/μl e relação A260/280 entre 1,8 a 2,0.

Para o isolamento e amplificação da região correspondente ao Exon I e Intron I do gene da grelina suína foi desenhado um par de *primers* com base nas informações disponíveis no GenBank (DQ663493, AY3730191 e AB5628971). O par de *primers* desenhado possuía as seguintes sequências de nucleotídeos, respectivamente:

GHR2 – Forward - 5' CCGAACACCAGAAAGTGCAG 3'

GHR2 - Reverse - 5' GGGACGGGGACTTACCATTG 3'

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μL/amostra, contendo 100 ng de DNA genômico, 0,5 μM de cada *primer*, tampão PCR 1X, 100 μM de dNTPS, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, em 35 ciclos, com a seguinte programação: 95°C por 5 minutos; 95°C por 30 segundos; 57°C por 30 segundos; 72°C por 30 segundos. Após estes ciclos, as amostras foram mantidas a 72°C por 5 minutos e a 4°C até serem retiradas do equipamento. Foi realizado um ajuste com gradiente de temperatura para escolha da temperatura ideal para realização da técnica de PCR.

Para verificar o resultado da reação de amplificação uma alíquota de 5μL de cada amostra foi diluída em 3μL de tampão de corrida (azul de Bromofenol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando tampão TBE 1X e brometo de etídio (0,05 μG/ml) a 70V por aproximadamente 40 minutos. Após esta etapa, o gel foi exposto à luz U.V e fotodocumentado para confirmação da eficiência da PCR.

Após o isolamento e a amplificação da região de interesse do gene da grelina pela PCR, as amostras foram submetidos à técnica de PCR-RFLP, que consiste na digestão por enzimas de restrição, as quais reconhecem sequências específicas de bases no DNA, onde a alteração de um par de bases pode criar ou abolir um sítio de restrição em um determinado locus do genoma, gerando um polimorfismo. Dessa forma, se o DNA for digerido com a

enzima de restrição adequada, o locus polimórfico pode ser observado pela alteração no tamanho do fragmento do DNA. Neste trabalho, a aplicação da técnica de RFLP para tentar identificar polimorfismos foi realizada utilizando-se a enzima de restrição Pst I (Invitrogen®). A sequência palindrômica e o sítio de restrição desta endonucleases é 5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5'.

As digestões foram realizadas em um volume de 8 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 5 unidades da Pst I. As amostras foram digeridas por uma hora a temperatura de 37°C em termociclador Biometra®.

Após a digestão, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (3,0%), em tampão TBE 1X com brometo de etídio a 60V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta e o gel foi fotodocumentado.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica utilizada para a extração de DNA das amostras de folículos pilosos de suínos se mostrou eficiente. As amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 0,5% corado com brometo de etídeo e após exposição à luz UV, obteve-se uma imagem representativa dos resultados da extração, conforme pode ser observado na Figura 1.

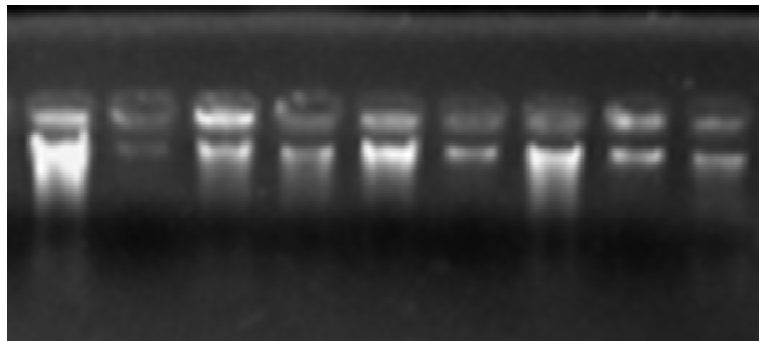


Figura 1: Imagem representativa dos resultados obtidos nas extrações de DNA através de eletroforese em gel de Agarose a 0,5%.

Os resultados obtidos na extração corroboram Laureano et al. (2006) que também utilizaram a técnica adaptada de Lima (2003) para extração de DNA de pelos de novilhas da raça Nelore. Após a extração, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro e todas as amostras possuíam, no mínimo, 100 ng/μL para utilização na etapa de PCR.

Na realização da técnica de PCR foi realizado o ajuste com gradiente de temperatura para escolha da temperatura ideal como pode ser observado na figura 2.

temperatures of the last gradient						
1 - 6:	55.0	55.2	55.9	57.0	58.2	59.4 °C
7 - 12:	60.6	61.8	62.9	64.0	64.7	65.0 °C
remaining time: 1h18m						

Figura 2: Gradiente de temperatura para PCR em termociclador Biometra®.

Os resultados obtidos com a técnica de PCR foram satisfatórios como observado na figura 3. Foi possível verificar que os iniciadores GHR FWD e REV utilizados foram eficientes, pois todas as amostras obtiveram um isolamento e amplificação da região de interesse do gene da grelina, gerando amplicons de aproximadamente 300pb.

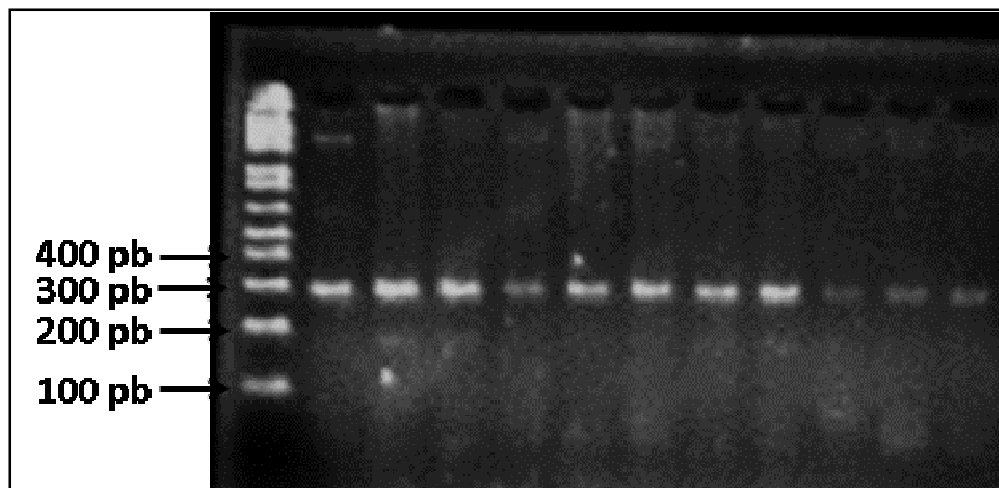


Figura 3: Imagem representativa do resultado das análises de PCR com os iniciadores GHR, FWD e REV. Gel de Agarose à 2%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

A partir dos resultados obtidos nesta etapa foi possível a realização da técnica de RFLP, onde as amostras continham apenas a região de interesse do gene da grelina avaliada neste trabalho e estas foram digeridas com a enzima Pst I. Os resultados podem ser observados na Figura 4.

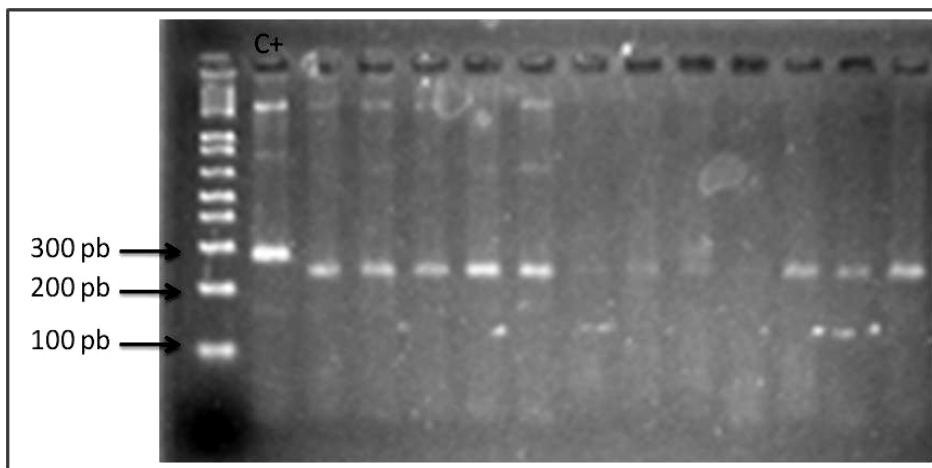


Figura 4: Imagem representativa do resultado das análises de RFLP com a endonuclease Pst I. Gel de Agarose à 3%. A= marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Invitrogen®) . C+= controle positivo com produto de PCR.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os produtos amplificados de PCR foram digeridos em apenas 1 fragmento com banda inferior a 300pb. Este mesmo padrão foi obtido em todas as 40 amostras correspondentes aos animais avaliados neste estudo, caracterizando um monomorfismo genético para a região avaliada com a técnica de RFLP/Pst I. Importante ressaltar que foi feito um novo gel com as mesmas amostras mostradas na figura anterior e estas obtiveram o mesmo padrão das outras com uma banda inferior a 300pb.

Estudos de Wojtysiak e Kaczor (2011) encontraram polimorfismos no gene da grelina em suínos Landrace utilizando a técnica de PCR-RFLP com a enzima Brs-I. Isto demonstra que outros estudos devem ser realizados através da utilização de outras enzimas de restrição e/ou outras técnicas para identificação de polimorfismo no gene do hormônio da grelina em suínos.

Apesar de este resultado indicar a inexistência de variação genética para região estudada do gene, o monomorfismo genético pode ser atribuído ao fato de que os animais avaliados neste estudo já integram um programa de seleção. Segundo Ayres e colaboradores (2006) pode-se haver uma diminuição da variabilidade genética da população quando ocorre uma seleção para outras características.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as técnicas de extração de DNA genômico e a aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região de interesse do gene da grelina foram eficazes, entretanto, a utilização da técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição Pst I não possibilitou a identificação de polimorfismo no gene do hormônio da grelina em suínos reprodutores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(a) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado externo. **Principais destinos**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 10 de março de 2015.

(b) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado externo. **Exportação**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 10 de março de 2015.

(c) ABIPECS. Relatórios: Estatísticas. Mercado interno. **Brasil-Produção**. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br>. Acesso em: 10 de março de 2015.

AYRES, D. R.; ALBUQUERQUE, L. G.; COSTA, R. B.; et al. Polimorfismos no gene da Leptina relacionados com escores visuais de conformação, precocidade e musculatura de bovinos da raça Nelore.. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2006, Jaboticabal. **Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2006.

BEDNAREK, M.A.; FEIGNER, S.D.; PONG, S.S.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, D.L.; SILVA, M.V.; et al. **Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor**. 1a. J Med Chem. 2000; 43(23):4370-76.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa, 2000.

CHO, R. J. et al. Genome-wide mapping with biallelic markers in Arabidopsis thaliana. **Nature Genetics**, New York, v. 23, p. 203-207, 1999.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F.; Biotecnologia animal. **Estudos Avançados** (USP. Impresso), v. 24, p. 123-147, 2010.

COWLEY, M.A.; SMITH, R.G.; DIANO, S.; TSCHOP, M.; PRONCHUK, N.; GROVE, K.L.; STRASBURGER, C.J.; BIDLINGMAIER, M.; et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron** 37: 649–661, 2003.

CUMMINGS, D.E.; PURNELL, J.Q.; FRAYO, R.S.; SCHMIDOVA, K.; WISSE, B.E.; WEIGLE, D.S. **A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans** Diabetes, 50 (2001), pp. 1714–1719.

DATE, Y.; KOJIMA, M.; HOSODA, H.; SAWAGUCHI, A.; MONDAL, M.S.; SUGANUMA, T. et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rat and human. **Endocrinology**. 2000; 141(11):4255-61.

DONG, X. Y. et al. Ghrelin and its biological effects on pigs. **Peptides**. 2009 Jun;30(6):1203-11. doi: 10.1016/j.peptides.2009.03.001. Epub 2009 Mar 20.

DU, F. X.; CLUTTER, A. C.; LOHUIS, M. M. Characterizing linkage disequilibrium in pig populations. **International Journal of Biological Science**. 2007. 3: 166–178.

ERLICH, H. A. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Immunology**, Vol, 9, No. 6, 1989

EUCLIDES FILHO, K. O melhoramento Genético Animal no Brasil: fundamentos, história e importância. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte. 1999, 63p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2007.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCid:548581. 2005.

GIL, F. M. M. **Polimorfismo no gene do hormônio grelina em búfalas (*Bubalus bubalis*) e sua associação com produção e qualidade do leite**. 2012. 57 f. Dissertação (Doutor) - Curso de Zootecnia, Departamento de Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

GUALILLO, O.; CAMINOS, J.; BLANCO, M.; GARCIA-CABALLERO, T.; KOJIMA, M.; KANGAWA, K. et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. **Endocrinology**. 2001; 142(2):788-94.

(a) GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, nov./dez. 2009.

(b) GUIMARÃES, S. E. F. Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Embrapa, 2009. p. 614-647.

HAYASHIDA, T.; MURAKAMI, K.; MOGI, K.; NISHIHARA, M.; NAKAZATO, M.; MONDAL, M.; et al. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. **Domestic Animal Endocrinology**. 2001;21:17–24.

HEDEMANN, M.S.; HOJSGAARD, S.; JENSEN, B.B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. **J Anim Physiol Anim Nutr** 2003;87:32–41.

KAIYA, H. et al. Ghrelin: A multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Volume 149, Issue 2, February 2008, p. 109-128.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y.; NAKAZATO, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**.1999 Dec 9;402(6762):656-60.

KOTUNIA, A.; ZABIELSKI, R. Ghrelin in the postnatal development of the gastrointestinal tract. **Journal Physiology Pharmacology**.2006;57(Suppl. 5):97-111.

LACERDA, D. R. et al. **A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas**. Lundiana, UFMG, v. 2, n. 3, p.87-92, 14 jan. 2002.

LAUREANO, M. M. M.; OTAVIANO, A. R.; COSTA, R. B.; et al. Characterization of polymorphisms within insulin-like growth factor-i and prolactin genes of three groups of nellore heifers. **World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, 2006. Belo Horizonte.

LIMA, S. P. G. Estudos do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio do crescimento bovino, em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama. **Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, FCAV**, 2003.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p.398-401, 1989.

MAPA. Animal. Mercado interno. Espécies. **Suínos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 10 de março de 2015.

MC CRACKEN, B.A.; SPURLOCK, M.E.; ROSS, M.A.; ZUCKERMAN, F.A.; GASKINS, H.R. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in piglet small intestine. **Journal of Nutrition**. 1999;129:613-9.

MOLIK, K. R. et al. New polymorphisms and expression of the porcine ghrelin (GHRL) gene in different pig breeds. **Journal Of Animal And Feed Sciences**, Fg, v. 20, n. , p.186-199, 18 nov. 2011.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.55, p.335-350,1987.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Journal of Animal Science**. 1990 Apr;262(4):56-61, 64-5.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**. 2001; 409(6817):194-8.

NOBLET, J.; Le BELLEGO, L.; van MILGEN, J. et al. Effects of reduced dietary protein level and fat addition on heat production and nitrogen and energy balance in growing pigs. **Animal Reserch**, v.50, p.227-238, 2001.

PAMILO, P. Genetic variation in heterogeneous environments. **Annales Zoologici Fennici**, 1988.25(1), 99-106.

PEIXOTO, J. O.; LEDUR, M. C.; FIGUEIREDO, E. A. P. Melhoramento genético. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango\\_de\\_corte/arvore/CONT000g0gyjqot02wx5ok026zxpgegv9oxm.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000g0gyjqot02wx5ok026zxpgegv9oxm.html)>. Acesso em: 25 abril 2015.

PEREIRA, J. C. C. Melhoramento Genético dos Suínos. In: PEREIRA, Jonas Carlos Campos. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: Embrapa, 2012. p. 614-647.

RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. **Denmark: Institute Of Biological Psychiatry**, Mental Health Centre Sct. Hans, S/D.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 1, n. 19, p.85-91, jan. 2006.

ROSSI, C. A. R. et al. **Dietas ajustadas para suínos através do modelo InraPorc®: desempenho, características de carcaça e impacto econômico**. Ciência Rural. 2013, vol.43, n.4, pp. 689-695.

SATO, T. et al. Structure, regulation and function of ghrelin. **Journal Biochemistry**. 2012;151(2):119–128 doi:10.1093/jb/mvr134.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, 2004. 15(1), 63-69. doi:10.1038/nrg1249.

SHIYA, T. et al. Plasmaghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**.87: 240–244, 2002.

SILVA, M. B. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estud. Biol.**, Ambiente Divers. 2012 jul./dez., 34(83), 157-163

SOORI, V. A.; WATANABE, K. N.; VALKONEN, J. P. T. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p. 164-170, 1999.

TOSHINAI, K.; YAMAGUCHI, H.; SUN, Y.; SMITH, R.G.; YAMANAKA, A.; SAKURAI, T.; et al. Desacylghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. **Endocrinology**2006;147:2306–14.



TRAMONTINI, P. Consumo da carne suína a experiência brasileira. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 5., São Paulo. **Anais**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p. 6-11.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP na other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.34, p.275-305, 2002.

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-189, 1989.

WIERUP, N. et al. Ghrelin and motilin are cosecreted from a prominent endocrine cell population in the small intestine. *J ClinEndocrinolMetab* 2007;92:3573–81.

WOLTERS, P. et al. Nucleotide diversity at homeologous loci in wheat. In: **Plant and Animal Genome Conference**, 8., 2000, San Diego. Abstracts... San Diego: [s.n.], 2000. p. 103.

WOJTYSIAK, D.; KACZOR, U. Effect of polymorphisms at the ghrelin gene locus on carcass, microstructure and physicochemical properties of longissimus lumborum muscle of Polish Landrace pigs. **Meat Science**, Volume 89, Issue 4, December 2011, p. 514-518.